



| | |
|--------------|---|
| Title | ヒト癌由来細胞株を用いたDipeptidase1の局在、機能解析 (内容・審査結果要旨) |
| Author(s) | 永井, 千晴 |
| Citation | |
| Issue Date | 2015-03-24 |
| URL | http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/621 |
| Rights | |
| DOI | |
| Text Version | none |

This document is downloaded at: 2020-01-06T12:26:03Z

論文内容要旨

| | |
|--|-------------------------------------|
| しめい 氏名 | ながい ちはる 永井 千晴 |
| 学位論文題名 | ヒト癌由来細胞株を用いた Dipeptidase 1 の局在、機能解析 |
| <p>Dipeptidase 1 (DPEP1) は、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質で、腎臓や小腸の刷子縁に存在する亜鉛依存型メタロプロテアーゼである。近年、DPEP1 は、大腸癌の優れたマーカーであることが報告され注目されているが、大腸癌における DPEP1 の高発現と悪性度や予後の悪さとの相関に関しては過去の報告により結論が異なり、明瞭ではない。また、癌細胞特性における意義も不明である。したがって本研究では、大腸癌由来細胞株を用いて DPEP1 の細胞内局在解析と機能解析を行った。</p> <p>まず 5 種類の大腸癌由来細胞 (LoVo, RKO, HT29, SW480, CaCO2)、ヒト胃癌/大腸癌由来 HCC56 細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞及びヒト肺癌由来 A549 細胞における DPEP1 発現をウェスタンブロット法により解析した。その結果、DPEP1 の発現量が他の細胞株に比べて著しく高いことから、その後の解析には HCC56 細胞を用いた。DPEP1 を特異的に認識する抗体を用いて免疫蛍光法および包埋前免疫電顕法による局在解析を行った所、播種後 3 日後の培養細胞では DPEP1 は細胞膜上に点状に分布し、これらは GPI アンカー型タンパク質である CD59 と一致したが、flotillin や caveolin などのラフトマーカーとは一致しなかった。また、一部は微絨毛部位に局在した。HCC56 細胞のヌードマウスへの異種移植組織およびヒト大腸癌組織を解析した結果、DPEP1 は主に細胞の apical ドメインに局在する他、一部の細胞ではその全周に分布した。</p> <p>次に RNAi 法を用いて DPEP1 の発現抑制実験系を確立し、機能解析を行った。細胞培養系および異種移植実験において DPEP1 発現低下は細胞増殖能に有意な影響を及ぼさなかった。DPEP1 が細胞外グルタチオンの分解代謝に関与することに注目し、同タンパク質の酸化ストレス耐性能への関与を調べた。DPEP1 の発現低下細胞にヒ酸水素二ナトリウム (AsV) を投与し、DNA の二重鎖切断をリン酸化 H2AX に対する抗体を用いて検出し、細胞核あたりの蛍光強度を定量比較した。その結果、正常細胞では影響が認められない AsV の濃度において、DPEP1 発現低下細胞株では AsV 添加群は対照群に比べ有意に DNA 損傷シグナルが増加した。</p> <p>以上の結果より、DPEP1 は細胞膜上の GPI アンカー型タンパク質特異的なドメインおよび微絨毛ドメインに分布すること、DPEP1 の発現レベルは細胞増殖能には影響を与えないが、その高発現は酸化ストレスの軽減に寄与する可能性が示唆された。また、本研究に用いた HCC56 細胞は DPEP1 の機能変化を解析する良いモデル細胞であることが示された。</p> | |

※日本語で記載すること。1200字以内にまとめること。

学位論文審査結果報告書

平成 26 年 12 月 24 日

大学院医学研究科長 様

下記の通り学位論文の審査を終了したので報告致します。

【審査結果要旨】

申請者 氏名 永井 千晴

学位論文題名 ヒト癌由来細胞株を用いた Dipeptidase 1 の局在、機能解析

評価結果

本研究で永井氏は、大腸癌における Dipeptidase 1 (DPEP1) の機能を追求するために、ヒト大腸癌株を用いて、局在および機能解析（増殖・移動/浸潤能・酸化ストレス）の実験を詳細に行った。

まず大腸癌細胞株 5 種から、DPEP1 高発現系である HCC56 細胞を選択し、播種 3 日後、7 日後の細胞内局在を観察し、DPEP1 は GPI アンカー型タンパク質特異的な細胞膜ドメインに分布しており、全周性分布から apical の微絨毛基部へ局在化することを明らかにした。HCC56 細胞における局在は、ヒト大腸癌における局在（高分化型が apical, 低分化型が全周性）に類似すると考えられた。さらに、機能解析では DPEP1 発現レベルによる増殖能の変化はみられないが、酸化ストレス軽減に寄与する可能性を示唆するデータが得られた。

永井 氏の研究は、DPEP1 抗体を自ら作成し、その有効性を検証し、様々な細胞生物学的実験により、DPEP1 の局在を明らかにした点に加え、DPEP1 の新たな機能として酸化ストレスの軽減を示唆した初めての論文である。

in vitro 系での局在の変化と大腸癌の分化度による DPEP1 発現部位の違いにも焦点をあて、今まで報告者によって大腸癌予後と DPEP1 の関連性がまちまちであったのも、DPEP1 が癌細胞の悪性化に関わるのではなく、ストレス回避に関わるのであれば、発現量だけでは正確な関連性は把握できないだろうと示唆している。これを踏まえた大腸癌予後と DPEP1 の関連性についても、研究が発展される可能性があると考ええる。

また大腸癌細胞のストレス回避機序解明、新規治療薬への発展性を伺わせ、学位論文に値すると評価した。

| | | | |
|--------|----|----|----|
| 論文審査委員 | 主査 | 橋本 | 優子 |
| | 副査 | 荻谷 | 慶喜 |
| | 副査 | 木村 | 隆 |